

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenl gungsschrift**
⑩ **DE 196 51 992 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 5/08
C 12 N 5/06
A 61 K 35/36

②1 Aktenzeichen: 196 51 992.6
②2 Anmeldetag: 13. 12. 96
④3 Offenlegungstag: 25. 6. 98

DE 196 51 992 A 1

⑦1 Anmelder:
Toloczyki, Christian, Dr., 86919 Utting, DE

⑦2 Erfinder:
Antrag auf Teilnichtnennung
Baur, Markus, Dr.rer.nat., Lausanne, CH; Hunziker,
Thomas, Prof.Dr.med., Oberhofen, CH; Limat, Alain,
Dr.rer.nat., Tavers, CH; Riedel, Wolfram, Dr.rer.nat.,
86919 Utting, DE; Toloczyki, Christian, Dr.rer.nat.,
86919 Utting, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
J. Invest. Dermatol. 91(2), S. 142-146, 1988;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Serum als Zusatz von Kulturmedium bei der Züchtung von stratifizierten Hautäquivalenten aus Stammzellen

⑤7 Die Erfindung betrifft die Anwendung eines speziellen Verfahrens zur Kultivierung von Haarfollikelzellen (ORS-Zellen = outer root sheet cells) und weiterer hauttypischer Zellen, wie z. B. Keratinozyten, Melanozyten etc. im Hinblick auf deren therapeutische bzw. kosmetische Anwendung bei Menschen und Tieren.

Gegenstand der Erfindung ist die Züchtung von stratifizierten Hautäquivalenten aus Hautzellen bzw. deren Stammzellen unter Verzicht auf Kulturzusätze von spende-, empfänger- oder artfremden Organismen und somit die Kultivierung von Zellen unter Anwendung homologer (arteigener) bzw. autologer (organismuseigener) Zusätze im Kulturmedium.

Gegenstand des Patentes ist die Anwendung von homologem oder autologem a) Serum und dessen Bestandteilen sowie b) einem Gemisch von Wachstumsfaktoren, als Zusätze zum Kulturmedium.

DE 196 51 992 A 1

Beschreibung

Methode der Wahl ist die Abdeckung der Wunde mit patienteneigener Haut, die beispielsweise als Mesh-Graft, Thiersch-Plastik oder als Lappen mit unterschiedlichen Methoden appliziert wird.

Problem: Mit der Entnahme von Haut oder ganzen evtl. vaskularisierten Gewebelappen wird eine zusätzliche Wunde geschaffen, die ihrerseits heilen muß. So ist z. B. eine Hautentnahmestelle für eine Mesh-Graft-Plastik sehr schmerzhaft und hinterläßt nach Abheilen eine flächige Narbe mit oft unzumutbarem kosmetischem Ergebnis. Bei wiederholt erforderlichen Eingriffen, z. B. im Rahmen der Behandlung chronischer Wunden, stehen außerdem Entnahmestellen oft nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung. Weiterhin sind mit dem Eingriff die Risiken einer Operation verbunden.

Zellkultivierung

Seit der Entwicklung von Rheinwald et al. (1975) und den Ergänzungen von Green (1979) hat die Kultivierung von Keratinozyten und deren Anwendung vor allem in der Verbrennungsmedizin einen Platz erobert (Rheinwald, J.G., et al., "Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: The Formation of Keratinizing Colonies From Single Cells", *Cell* 6: 331-344, 1975; Green, H. et al., "Growth of Cultured Human Epidermal Cells Into Multiple Epithelia Suitable for Grafting", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 5665-5668, 1979). Zur Anwendung kommen inzwischen kultivierte Zellen aus verschiedenen Spenderlinien.

Als geeignetes Kulturmedium haben sich Eagles Medium unter Zusatz verschiedener Zytokine bzw. Zusätze aus unterschiedlichen Seren, vor allem foetalem Kälberserum (FKS); erwiesen (Childs C.B., Proper J.A., Tucker R.F., Moses H.L., "Serum Contains a Platelet-Derived Transforming Growth Factor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 5312-5316, 1982; vgl. auch Green, aaO. 1979). An der Kultivierung unter Verzicht auf bovine und andere artfremde Substanzen wird immer wieder gearbeitet.

Die Überlebenszeit von Transplantaten aus empfangnerfremden Zellkulturen ist nach wie vor gering. Sie geht i.d.R. über wenige Tage nicht hinaus. Die körperfremden Zellen dienen v.a. als Quelle der von den Keratinozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren, die Prozesse induzieren, die im Zusammenhang mit der Wundheilung von Bedeutung sind. Das allogene Material wird i.d.R. innerhalb einer Woche abgestoßen und muß, um eine Heilung zu erreichen, vom Empfängerorganismus durch autologes Material ersetzt werden (Bennet et al., *Am. J. of Surgery*, 166, 1993: 74-81; Phillips T., et al., "Culture of Epidermal Autografts and Allografts: A Study of Differentiation and Allograft Survival", *J. Am. Acad. Dermatol.* 23: 189-198, 1990).

Patienten eigene Keratinozyten

Weitere Entwicklungen zielten daher auf die Kultivierung autologer, d. h. patienteneigener Keratinozyten (O'Connor, N.E. et al., "Grafting of Burn Wounds With Cultured Epithelium Prepared From Autologous Epidermal Cells", *Lancet* 1: 75-78, 1981; Phillips, T. et al., "Treatment of Skin Ulcers With Cultured Epidermal Allografts", *J. Am. Acad. Dermatol.* 21: 191-199, 1989; Henckel, V. et al., "Transplantation of Keratinocytes in the Treatment of Wounds", *Am. J. of Surgery* 170: 75-83, 1995; "Die Verwendung von Keratinozytenkulturen in der Schwerbrandverletztenbehandlung", *Unfallchirurg* 98: 229-232, 1995). Die Anwachsrate der Transplantate lassen sich durch diese Techniken auf

40 75% erhöhen.

Stand der Technik hierbei ist, wie schon bei der Züchtung allogener Hautgewebe, neben der Verwendung artfremder oder patientenfremder Zusätze im Kulturmedium, wie z. B. FKS, sich ebenfalls artfremder Zellkulturen aus Fibroblasten (Bindegewebszellen), auf denen die Hautkulturen wachsen sollen (Feeder Layer), zu bedienen. Feeder Layer sind generell für die Züchtung von Hautzellen bisher erforderlich.

Für die derzeitigen Verfahren bestehen folgende Probleme:

Einsatz von FKS bei der Kultivierung: Das Infektionsrisiko mit BSE und anderen möglichen Krankheiten ist erheblich.

Einsatz von artfremden (3T3-Zellen der Maus) oder anderen heterogenen Fibroblastenkulturen (Feeder Layer): Gefahr einer Übertragung von artfremden Krankheitserregern und Etablieren neuartiger Infektionswege.

Herstellungsdauer: Multilayer 3-4 Wochen:

- Nur begrenzte Anwachsrate, bei chronischen Wunden z. B. nur 10-20%.

Als weiterer, vielversprechender biotechnologischer Ansatz wurde die Verwendung von Haarfollikelzellen (ORS-Zellen = Outer Root Sheath-Zellen) evaluiert. Die ORS-Zellen werden als Vorläuferzellen (= Stammzellen = Precursor-Zellen) der Keratinozyten angesehen (Jing-Shan, Y. et al., "Upper Human Hair Follicle Contains a Subpopulation of Keratinocytes with Superior In Vitro Proliferative Potential", *J. Invest. Dermatol.* 101: 652-659, 1993). Sie sind weniger differenzierte und somit replikationsfähigere und vitalere Zellen, die sich leichter und schneller in Kultur replizieren lassen sowie eine höhere Take-Rate aufweisen. Ein Verfahren für die Kultivierung von ORS-Zellen ist erstmals 1981 beschrieben worden (Weterings, P.J.J.M. et al., "A Method for Culturing Human Hair Follicle Cells", *Brit. J. Dermatol.* 104: 1-5, 1981).

In vitro vermehrte Haarwurzelzellen werden z. B. in Suspension, als Inseln in einer Trägermatrix (z. B. Fibrinkleber), auf Wunden aufgebracht. Diese Minikulturen wachsen in vivo zu deckendem Hautepithel heran und tragen zum Wundverschluß bei (Moll, I., "Proliferative Potential of Different Keratinocytes of Picked Human Hair Follicles", *J. Invest. Dermatol.* 105: 14-21, 1995).

Eigene Arbeiten im Vorfeld der Erfindung

Uns ist gelungen, aus ORS-Zellen ein stratifiziertes, d. h. mehrschichtiges und differenziertes Hautäquivalent in vitro heranzuziehen (Limat, A. et al., "Successful Treatment of Chronic Leg Ulcers With Epidermal Equivalents Generated From Cultured Autologous Outer Root Sheath Cells", *J. Invest. Dermatol.* 107: 128-135, July 1996). Das gezüchtete Zellmaterial ist insofern als Hautäquivalent zu bezeichnen, als es dem natürlichen Hautaufbau sehr nahe kommt, jedoch einige für die Haut typische Strukturen, wie Schweiß- oder Talgdrüsen oder Haare nicht aufweist. Bei der Behandlung chronischer Wunden wurde damit eine Take Rate von 60-80% erreicht, entsprechend derjenigen von Transplantaten, die mit konventionellen Techniken vom Patienten gewonnen werden (eigene Daten).

Die durch die neuen Techniken erreichten Qualitätssteigerungen verbessern die Anwachsrate und ermöglichen erstmalig die effiziente Behandlung chronischer Wunden mit aus Zellen gezüchteten, dermalen Äquivalenten.

Das von Limat et al. publizierte Verfahren zur Aufzucht stratifizierter Hautäquivalente aus ORS-Zellen haben wir weiterentwickelt, um die Risiken einer Krankheitsübertragung infolge der Verwendung empfängerfremder Seren im Kulturmedium bzw. empfängerfremder Zellen für den Feeder Layer auszuschalten. Mit unserem Verfahren wurde erstmalig in der Kultur dermalen Äquivalente aus ORS-Zellen homologes sowie autologes Serum eingesetzt.

Dazu verwendeten wir KDM-Medium (Clonetics, PromoCell) oder MCDB153-Medium (z. B. von Sigma). Dem Medium gaben wir 10-15% autologes, d. h. empfängereigenes Serum, oder homologes, d. h. gepooltes humanes Serum zu. Sowohl in der Primärkultur, der Auswanderungs- und Vermehrungsphase der ORS-Zellen aus den Haarfollikeln, als auch in der Sekundärkultur, der Rekonstitutions- und Stratifizierungsphase, zeigte sich gegenüber dem gleichen, jedoch mit FKS versetzten Medium ein nahezu verdoppeltes Wachstum. Auch die Zellen selbst lieferten ein deutlich vitaleres, kubisches Aussehen. In der Kultur waren die Zellen erstaunlich homogen.

Das Verfahren funktioniert prinzipiell auch mit davon abweichenden Serumkonzentrationen. Zwischen 3% und 60% ist der relevante Bereich anzusiedeln. Serum enthält eine Vielzahl von Stoffen, die als wirksame Bestandteile anzusehen sind. Eine Charakterisierung ist bis heute nicht durchgeführt. Generell handelt es sich größtenteils um Zytokine.

Mit der beschriebenen Erfindung ging eine Optimierung der Replikationsrate und eine Verkürzung der Replikationsintervalle einher. Somit gelang es erstmals, die Kulturdauer von bisher 3-4 Wochen auf insgesamt ca. 2-3 Wochen zu reduzieren.

Für die Kultivierung der ORS-Zellen ohne Feeder-Zellen verwendeten wir modifiziertes MCDB153-Medium als definiertes Medium mit und ohne Hypophysenextrakt (Boyce, S.T., Ham, L.G., "Cultivation, Frozen Storage and Clonal Growth of Normal Human Epidermal Keratinocytes in Serum Free Media", *J. Tissue Cult. Meth.* 9: 83-93, 1985; Pitelkow, M.R. et al., "Two Functional Distinct Classes of Growth Arrest States in Human Prokeratinocytes That Regulate Clonogenic Potential", *J. Invest. Dermatol.* 86: 410-417, 1986; Rosdy, M., Clauss, L.C., "Terminal Epidermal Differentiation of Human Keratinocytes Grown in Chemical Defined Medium on Inert Filter Substrates at the Air-Liquid Interface", *J. Inv. Dermatol.* 95: 409-414, 1990) sowie alternativ NR-3-Medium mit und ohne Hypophysenextrakt (Baur, M. et al., "Immortalised Human Skin Cells With a Highly Conserved Differentiation and Metabolism Profile as an Alternative in Toxicology Testing", *In Vitro Toxicology*, submitted). Die Kulturschalen waren mit humanem Fibronektin bzw. humanem Kollagen beschichtet. Sowohl mit als auch ohne Hypophysenextrakt gelang es, die ORS-Zellen zu einer vergleichbar guten Vermehrung zu bringen.

Das Wachstum der ORS-Zellen konnte weiterhin verbessert werden durch die Zugabe von PRP (platelet released peptides), dem Inhalt der alpha-Granula von humanen bzw. empfängereigenen Thrombozyten ins Kulturmedium. Die Herstellung von PRP erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Davey, M.G. and Lüscher, E.F., "Release Reactions of Human Platelets Induced by Thrombin and Other Agents", *Biochim. Biophys. Acta* 165: 490-506, 1968). PRP wurde in Konzentrationen von 0,01% bis 20% eingesetzt. Dabei erwies sich der Bereich unter 1% als wirksamer, die besten Resultate wurden bei 0,05% erreicht.

Zur Optimierung der Take-Rate wird die optimierte Vorbereitung des Transplantatlagers postuliert. Bereits in den frühen 80er Jahren wurde berichtet, daß thrombozytäre

Wachstumsfaktoren die Granulation, Vaskularisierung und den Matrixaufbau bei Wunden fördert (Bowen-Pope, D.I. et al., "Platelet-Derived Growth Factor In Vivo: Levels, Activity, and Rate of Clearance", *Blood* 64: 458-469, 1964; Smith, J.C. et al., "Growth Factors Adherent to Cell Substrate Are Mitogenically Active In Situ", *Nature* 296: 154-156, 1982; Knighton, D.R. et al., "Role of Platelets and Fibrin in the Healing Sequence", *Ann. Surgery* 196: 379-387, 1982; Bowen-Pope, D.I. et al., "Polypeptide Transforming Growth Factors Isolated From Bovine Sources and Used for Wound Healing In Vivo", *Science* 219: 1329-1330, 1983).

Unser Anliegen war, die gezüchteten Hautäquivalente auf ein optimiertes Granulationslager zu applizieren. Daher sollte das Transplantatlager möglichst eng an die Bedingungen der Zellkultur angepaßt werden. Die Transplantatlager von 5 Patienten, die für eine Mesh-Graft vorgesehen waren, wurden so bis zu vier Wochen mit den, u. a. PRP-haltigen, Kulturmedien konditioniert. Die Transplantate wuchsen sämtlich an. Die Take-Rate lag 14 Tage post applicationem bei nahezu 95% der Flächen. Die Restdefekte schlossen sich bis auf einen Fall nach weiteren zwei Wochen. Nur in einem Fall mußte erneut Kulturmaterial aufgebracht werden. Dann konnte auch hier nach weiteren 4 Wochen eine komplette Abheilung erzielt werden.

Zur Optimierung der Handhabung der gezüchteten stratifizierten Hautäquivalente wurden die ORS-Zellen im Rahmen der Sekundärkultur auf Hyaluronsäuremembranen ausgesät. Zwei Patienten wurden mit derartig gezüchteten Hautäquivalenten behandelt, indem diese zusammen mit den Membranen auf das Transplantatlager aufgebracht wurden, die Membran in direktem Kontakt mit dem Lager, darauf die stratifizierten Hautäquivalente. In beiden Fällen wurde eine Abheilung erreicht. Alternativ können auch andere biodegradable Polymere, wie z. B. Alginate, Polylaktide verwendet werden.

Neu und Bestandteil dieses Patentes ist die:

Kultivierung von ORS-Zellen, z. B. als stratifiziertes, dermales Äquivalent, unter Verzicht auf art- bzw. spender- bzw. empfängerfremde Zellen, derartige Medien oder derartige Zusätze

therapeutische bzw. kosmetische Anwendung dieser Kulturen

Vorbereitung eines Transplantatlagers mit Medien, die für die Kultur von Zellen, wie z. B. ORS-Zellen geeignet sind

Vorbereitung eines Transplantatlagers mit Medien, in denen bereits Zellkulturen gehalten worden sind (konditionierte Medien)

Technik, Gewebe des Spenders unter Bedingungen des dem Spender eigenen Milieus in vitro heranzuziehen (autologes Kulturverfahren) und dadurch jedes denkbare Risiko der Übertragung von Krankheitserregern zwischen verschiedenen Tierespezies oder innerhalb derselben Art zu vermeiden,

Verwendung von resorbierbaren Folien als Träger für die Kultivierung von ORS-Zellen im Rahmen der Transplantation.

Patentansprüche

1. Kulturmedium zur Züchtung von Zellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß homologes oder autologes Serum bzw. wirksame Bestandteile davon zugesetzt sind.
2. Kulturmedium nach Anspruch 1 zur Züchtung hauttypischer Zellen.

3. Kulturmedium nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium 5 bis 50 % Serum enthält.
4. Kulturmedium nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium 10 bis 15% Serum enthält. 5
5. Kulturmedium nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß außerdem PRP (platelet released peptides) oder eine Kombination darin enthaltener Wirkstoffe zugesetzt ist.
6. Kulturmedium nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß PRP in einer Konzentration von 0,01 - 20% zugesetzt ist. 10
7. Kulturmedium nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß PRP in einer Konzentration von 0,01 - 1% zugesetzt ist. 15
8. Kulturmedium nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß PRP in einer Konzentration von 0,05% zugesetzt ist.
9. Kulturmedium nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Züchtung dermalen 20 Äquivalente aus ORS-Zellen eingesetzt wird.
10. Verwendung des Kulturmediums nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Implantation oder Transplantation.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das Arzneimittel gezüchtete Zellen enthält. 25
12. Verwendung des Kulturmediums nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Vorbereitung der Implantation oder Transplantation von Zellen.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Vorbereitung die Züchtung der für die Implantation oder Transplantation eingesetzten Zellen umfaßt. 30
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei Vorläufer- bzw. Stammzellen zur Herstellung von stratifizierten Hautäquivalenten verwendet werden. 35
15. Verwendung des im Verfahren gemäß den Ansprüchen 10 bis 14 erhaltenen konditionierten Kulturmediums zur Vorbereitung des Transplantatlagers für die Transplantation der hergestellten Hautäquivalente. 40
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, wobei Folien aus biodegradablen, resorbierbaren Materialien als Träger für die Züchtung der Zellen bzw. für die Applikation der stratifizierten Hautäquivalente verwendet werden. 45
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Folien Alginate, Hyaluronsäureester-, Polylaktid-Polymere oder andere biodegradable Polymere sind

50

55

60

65